

IMMUNOADSORBER FOR REMOVING ENDOTOXINS FROM FLUIDS, METHOD FOR THE PRODUCTION AND USE THEREOF

Patent number: WO0008463

Publication date: 2000-02-17

Inventor: HEINRICH HANS-WERNER (DE); MEYER UDO (DE); HLINAK ANDREAS (DE); KRUSCHKE PETER (DE); SASSE MIRKO (DE)

Applicant: PRIVATES INST BIOSERV GMBH (DE); HEINRICH HANS WERNER (DE); MEYER UDO AQUACONSULT GMBH (DE); HLINAK ANDREAS (DE); KRUSCHKE PETER (DE); SASSE MIRKO (DE)

Classification:

- **international:** (IPC1-7): G01N33/48

- **european:** C07K16/12A

Application number: WO1999DE02486 19990805

Priority number(s): DE19981039429 19980805

Also published as:

WO0008463 (A3)

Cited documents:

- DE4113602
- DE19653669
- XP002129937
- JP6034633

[Report a data error here](#)

Abstract of WO0008463

The invention relates to an immunoadsorber for specific removal of bacterial endotoxins from fluids or aqueous, crystalline and/or colloidal solutions, emulsions and body fluids (e.g. blood, plasma, lymph, cerebrospinal fluid) and/or fluids (e.g. serum, dialysate) obtained from body fluids. The endotoxins are bonded (in vitro, ex vivo or in situ) to avian endotoxin antibodies and eliminated from said fluid. A method for the production of the inventive immunoadsorber is also disclosed. The invention can be used in medicine, veterinary medicine, biomedicine, biomedical techniques, dentistry, pharmacy, biomedical research, pharmaceutical research, medical research, food production and, optionally, environmental protection.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

PCT

WELTOORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : G01N 33/48		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/08463
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 17. Februar 2000 (17.02.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE99/02486		(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CR, CU, CZ, EE, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 5. August 1999 (05.08.99)			
(30) Prioritätsdaten: 198 39 429.2 5. August 1998 (05.08.98) DE			
(71) Anmelder (<i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i>): PRI- VATES INSTITUT BIOSERV GMBH [DE/DE]; Dr.-Lorenz-Weg 1, D-18059 Rostock (DE).			
(72) Erfinder; und		Veröffentlicht	
(75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>): HEINRICH, Hans-Werner [DE/DE]; Hauptstrasse 4, D-17498 Riemserort (DE). MEYER, Udo [DE/DE]; Mitteldorfstrasse 4, D-18239 Hastorf (DE). HLINAK, Andreas [DE/DE]; Wollankstrasse 117, D-13187 Berlin (DE). KRUSCHKE, Peter [DE/DE]; Boddenblick 2, D-17498 Insel Riems (DE). SASSE, Mirko [DE/DE]; Küstriner Strasse 33a, D-15517 Fürstenwalde (DE).		<i>Ohne internationalem Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
(74) Anwalt: BAUMBACH, Fritz; Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE).			
(54) Title: IMMUNOADSORBER FOR REMOVING ENDOTOXINS FROM FLUIDS, METHOD FOR THE PRODUCTION AND USE THEREOF			
(54) Bezeichnung: IMMUNADSORBER ZUR ENTFERNUNG VON ENDOTOXINEN AUS FLÜSSIGKEITEN, VERFAHREN ZU IHRER HERSTELLUNG UND VERWENDUNG			
(57) Abstract			
The invention relates to an immunoadsorber for specific removal of bacterial endotoxins from fluids or aqueous, crystalline and/or colloidal solutions, emulsions and body fluids (e.g. blood, plasma, lymph, cerebrospinal fluid) and/or fluids (e.g. serum, dialysate) obtained from body fluids. The endotoxins are bonded (in vitro, ex vivo or in situ) to avian endotoxin antibodies and eliminated from said fluid. A method for the production of the inventive immunoadsorber is also disclosed. The invention can be used in medicine, veterinary medicine, biomedicine, biomedical techniques, dentistry, pharmacy, biomedical research, pharmaceutical research, medical research, food production and, optionally, environmental protection.			
(57) Zusammenfassung			
Die Erfindung beschreibt einen Immunadsorber zum spezifischen Entfernen bakterieller Endotoxine aus Flüssigkeiten, wässrigen, kristallinen und/oder kolloidalen Lösungen, Emulsionen und Körperflüssigkeiten (wie beispielsweise, Blut, Plasma, Lymphe, Cerebrospinalflüssigkeit) und/oder aus Körperflüssigkeiten gewonnene Flüssigkeiten (wie beispielsweise Serum, Dialysat). Die Endotoxine werden (in vitro, ex vivo oder in situ) an viare anti-Endotoxinantikörper gebunden und somit aus der Flüssigkeit eliminiert. Gleichzeitig wird ein Verfahren zur Herstellung des Immunadsorbers beschrieben. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Medizin, Veterinärmedizin, Biomedizin, Biomedizintechnik, Zahnmedizin, Pharmazie, die biologische, pharmazeutische und medizinische Forschung, die Lebensmittelherstellung und gegebenenfalls der Umweltschutz.			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		

Immunadsorber zur Entfernung von Endotoxinen aus Flüssigkeiten, Verfahren zu ihrer Herstellung und Verwendung

Endotoxine sind komplexe Lipopolysaccharidmoleküle (LPS), die in der äusseren Zellwand gramnegativer Bakterien vorkommen und bei deren Zerfall freigesetzt werden. In vivo wird das LPS an ein Serumprotein (LBP) gebunden und nachfolgend via LPS-Rezeptoren (CD 14) der Monozyten/Makrophagen und dendritischen Zellen aufgenommen, wobei die CD14⁺ positiven Zellen aktiviert werden und massiv verschiedene Zytokine (IL-1, TNFa, IL-6, IL-8) freisetzen. Die LPS-induzierte Zytokinfreisetzung führt, unterstützt durch die Bakterien-induzierte Komplementaktivierung zu lebensbedrohendem Fieber (daher werden die LPS-Moleküle auch als Pyogene bezeichnet), diffuser intravasaler Blutgerinnung mit Freisetzung weiterer „Schockfaktoren“ (PAF, Prostaglandine), Änderung der Gefäßpermeabilität mit nachfolgendem Flüssigkeitsverlust in die Gewebe und konsekutivem Blutdruckabfall, Kreislaufzusammenbruch und hämorrhagischen Nekrosen und schliesslich über ein Multiorganversagen zum Tod. Krankheitsbilder, bei denen die bakterielle Endotoxämie eine prädominante Rolle spielt, sind die gramnegative Sepsis, der septische Schock, das akute Leberversagen, die akute Pankreatitis und das akute respiratorische Distress-Syndrom (ARDS), wobei diese Erkrankungen auch heute noch durch eine außerordentlich hohe Letalität (bis zu 80%) charakterisiert sind. Die Endotoxine gelangen jedoch nicht nur durch einen bakterielle Invasion in den Körper, sondern können auch als „pyogene“ Verunreinigung mit Infusionslösungen, Infusionsbestecken, Biomaterialien und mit gentechnisch (bakteriell) erzeugten pharmazeutischen Produkten exogen appliziert werden.

Um Endotoxinverunreinigungen zu entfernen, werden Verfahren, wie die Hitzesterilisation, Dampfsterilisation, Bestrahlen mit γ -Strahlen, die Behandlung mit Säuren oder Laugen (z.B. US 3644175 und US 3659027), die Adsorption an unspezifisch bindende Substanzen (wie Aktivkohle, Ionenaustauscherharze, Polymyxin B, DEAE (US 3897309) oder andere stickstoffhaltige Gruppen (US 4381239), Amine (EP 0308239, EP 0333474, DE 19648954), Polyäthylenimin (DE 4209988), und Surfactantmoleküle (US 4412985)) angewandt. Der grösste Teil dieser Verfahren ist ausreichend, wenn der verbleibende Endotoxinspiegel 0,5 ng/ml nicht überschreitet, wenn keine Zerstörung von in Lösung vorhandenen Wirksubstanzen zu verzeichnen ist, und wenn keine für die Endotoxinelimination und/oder –

inaktivierung eingesetzten Substanzen als bioinkompatible Verunreinigung in Lösung verbleiben. Ein entscheidender Nachteil aller dieser Verfahren besteht in der unzureichenden Effizienz und fehlenden Spezifität der Elimination, die zum Teil auch andere in den Lösungen enthaltenen, weil unspezifisch wirkend, Substanzen eliminiert oder zumindest deren Lösungskonzentration reduziert. Die bisher für die Endotoxinbindung patentierten Materialien sind ausserdem dadurch charakterisiert, daß ein Austausch zwischen freiem und gebundenem Endotoxin nicht ausgeschlossen werden kann, so daß die Elimination einen Grenzwert nicht unterschreiten kann.

Die unzureichende Spezifität der Endotoxinbindung kann durch den Einsatz von Antikörpern gegen LPS überwunden werden, die gegen die speziesübergreifenden „Core Polysaccharide“ und/oder den Lipid A-Anteil der Endotoxinmoleküle gerichtet sind, und mit ausreichend hoher Avidität ausgestattet, in ausreichend hoher Konzentration eingesetzt, Endotoxin effizient und spezifisch aus den vorgelegten Lösungen entfernen. Dafür einsetzbare polyklonale Antikörper werden üblicherweise von Säugetieren gewonnen. Dem Fachmann ist bekannt, daß dies im Falle von LPS-Antikörpern auf Grenzen stößt, da Endotoxine für Säuger außerordentlich toxisch sind, sie darüber hinaus auch nur eine geringe Antigenität aufweisen und speziesübergreifende anti-LPS-Antikörper nur in Spuren induziert werden.

Es gelang die Etablierung von Hybridomzellen, die monoklonale anti-LPS-Antikörper synthetisieren. Ihrem umfangreichen Einsatz standen bisher verschiedene Hindernisse im Wege. In früheren Patentschriften wurde zwar die zu erwartende hohe Spezifität zweifelsfrei anerkannt (DE 4113602, DE 4209988) aber vorrangig die hohen Kosten als nachteilig bemängelt. Der großtechnische Einsatz monoklonaler Antikörper, die als Ascites in Mäusen und anderen Kleinnagern gewonnen werden, ist auch aus Gründen des Tierschutzes nicht zu realisieren, obwohl diese Antikörper am ehesten in den notwendigen Konzentrationen vorliegen dürften. Die Antikörperproduktion mittel Hybridoms in Zellkultur bedingt vorrangig die hohen Kosten, da die Antikörper angereichert (konzentriert) werden müssen und die Zellkultur absolute Sterilbedingungen entweder unter serumfreien Bedingungen oder in LPS-freien Serum erfordert.

Erstaunlicherweise vertragen Vögel große Mengen von LPS ohne klinische Reaktion. Im Ergebnis einer künstlichen Immunisierung können hohe spezifische

Antikörperkonzentrationen im Plasma und Eirotter erzielt werden. Wird die Antikörperproduktion unter Verwendung von SPF-Hühnern durchgeführt, können sowohl die erforderlichen Konzentrationen an Antikörpern, als auch die notwendige Menge kostengünstig auch für eine medizinische Anwendung hergestellt werden.

Nachteilig für eine medizinische Anwendung von „Säugetier“-Antikörpern ist, daß in Serum oder Plasma die Aktivierung des menschlichen Komplementsystems erfolgt. Aktiviertes Komplement kann unter bestimmten Umständen schwere Erkrankungen hervorrufen. Diese Eigenschaft ist an den Fc-Rezeptor der Immunglobuline gebunden, so daß entweder diese Antikörper nur als Fab-Fragmente eingesetzt werden können oder der Fc-Teil des Antikörpers an ein Trägermaterial gebunden und damit biologisch inaktiviert wird (DE 19653669). Zumindest die Verwendung von Fab-Fragmenten verteuert das Verfahren beträchtlich.

Der Erfindung lag deshalb die Aufgabe zugrunde, Immunadsorber zur Entfernung von Endotoxinen aus Flüssigkeiten zu entwickeln, die die Nachteile des beschriebenen Standes der Technik nicht aufweisen.

Die Erfindung wird gemäß den Patentansprüchen 1, 7 und 9 realisiert. Die Unteransprüche sind Vorzugsvarianten. Wesentlicher Bestandteil der erfindungsgemäßen Immunadsorber sind spezifische aviäre Immunglobuline vom Typ IgY, die neben einer überraschend festgestellten außerordentlichen Avidität und übergreifenden Spezifität zu Endotoxinen das menschliche Komplementsystem nicht aktivieren.

Die beschriebene Serospezifität von monoklonalen Antikörpern gegen LPS, erlauben ausschließlich die sehr selektive Elimination definierter LPS-Moleküle. Durch die Verwendung von Antigenen gegen die speziesübergreifende „Core-Polysaccharide“ und/oder den Lipid-A-Anteil des Endotoxinmoleküls bei der Immunisierung der Hühner werden polyklonale Antikörper erzeugt, die erfindungsgemäß eine breites Spektrum von LPS-Molekülen erfassen und somit den Nachteil, der für monoklonale Antikörper beschrieben worden ist, überwinden.

Der erfindungsgemäße Immunadsorber ist besonders geeignet, säure- und laugenempfindliche, hitzesensitive, strahlenempfindliche Lösungen mit oder ohne Serum von LPS zu befreien. Weiterhin ist der Einsatz bei gentechnisch hergestellten Pharmaka oder ähnlichen Produkten, die als Produktionsquelle gramnegative *E. coli*-Stämme verwenden und deshalb immer eine potentielle Verunreinigung mit LPS

aufweisen können, angezeigt. Außerdem soll der Einsatz beim Reinigen von Lösungen mit schwachen Endkonzentrationen an Wirkstoff wegen der hohen Spezifität und Avidität der Antikörper besonders hervorgehoben werden.

Die aviären Antikörper werden vorzugsweise kovalent aber auch adsorptiv an natürliche oder synthetische Trägermaterialien gekoppelt oder über Spacer oder Linker an diese so gebunden, daß kein Antikörperleakage (Abdiffundieren des Antikörpers nach der Auswaschphase) nachweisbar ist. Die Trägermaterialien können als Partikel für batch-type-Reinigung, als Säulen für Großvolumenreinigung oder in Form von Membranen (Schläuche, Hohlfasern) eingesetzt werden.

AUSFÜHRUNGSBEISPIEL 1

Herstellung spezifischer IgY durch Immunisierung von Hühnern mit LPS:

10 Tage nach Aufstellung werden 4 Hühner mit je 100 µg LPS (Escherichia coli J5, Fa. Sigma) immunisiert. Das Antigen ist in 0,5 ml PBS gelöst und wird unmittelbar vor Immunisierung in 0,5 ml kompletten Freundschen Adjuvans dispergiert. Die Immunisierung erfolgt i.m. in 5 Depots. 3 Wochen nach der ersten Immunisierung werden die Hühner mit gleicher Antigendosis unter Verwendung inkompletten Freudschen Adjuvans erneut immunisiert. Nach weiteren 3 Wochen erfolgt eine zweite Boosterung. Ab 8. Woche nach Immunisierungsbeginn werden die Eier für die Gewinnung spezifischer IgY gesammelt. Dazu wird das Eidotter präpariert und die darin enthaltenen Antikörper nach mehreren Gefrier-Tau-Zyklen durch fraktionierte Fällung gewonnen. Pro Dotter können zwischen 20 und 50 mg IgY präpariert werden, 5 – 10 mg sind üblicherweise spezifische Antikörper.

Kopplung an CNBr-Sepharose (Fa. Pharmacia):

10 mg spezifischer Antikörper werden nach Vorschrift des Herstellers an 5 ml CNBr-Sepharose gekoppelt.

Entfernung von LPS aus Puffer (Batch-Verfahren):

PBS wird mit 25 µg/ml LPS (E. coli J5) versetzt. 1 ml LPS-PBS wird mit 1 ml IgY-Sepharose gemischt und für 1 h bei Raumtemperatur unter leichtem Rühren inkubiert. Nach dieser Zeit wird der Gehalt an LPS im Puffer und am Gel gebunden nach Auftrennung mittels Polyacrylamidgel-Elektrophorese bestimmt (Abbildungen 1

und 2). Es ist ersichtlich, daß homologes LPS quantitativ aus dem Puffer entfernt wurde.

AUSFÜHRUNGSBEISPIEL 2

10 mg spezifische Antikörper wurden nach Vorschrift des Herstellers an 5 ml Affi-Prep Hz Gel (Fa. BIO-RAD) gekoppelt.

LPS folgender Spezies wurden in einer Konzentration von je 25 µg/ml in PBS gelöst: E. coli J5, E. coli O111:B4, Salmonella enteritidis, Shigella flexnerie und Bordetella bronchiseptica.

Je 1 ml LPS-PBS wird mit 1 ml IgY-Sepharose gegen LPS von E.coli J5 gemischt und für 1 h bei Raumtemperatur unter leichtem Röhren inkubiert. Nach dieser Zeit wird der Gehalt an LPS im Puffer und am Gel gebunden nach Auf trennung mittels Polyacrylamidgel-Elektrophorese bestimmt. Auch LPS heterologer Herkunft wird quantitativ aus dem Puffer entfernt.

AUSFÜHRUNGSBEISPIEL 3

5 ml ONB-Sepharose 4FF (39 µmol/ml Gel) wird aus Aceton in Wasser übertragen und mit 5 ml IgY-Lösung (22 mg/ml) vermischt. Der pH wird auf 3,0 eingestellt und die Suspension für 1 h bei Raumtemperatur leicht bewegt. Nach dem Koppeln wird das Gel gewaschen und unter Verwendung von 1 M Ethanolamin in 0,1 M Boratpuffer geblockt. Nach erneutem Waschen wird das Gel für 3 d in Boratpuffer (pH 8,3) leicht bewegt. Nach alkalischer Hydrolyse konnte eine gekoppelte Proteinkonzentration von 12 mg/ml Gel ermittelt werden.

1 ml IgY-Gel wird in eine Minisäule verbracht und durch alternatives Waschen mit saurem und neutralem PBS equilibriert.

10 ml Spenderplasma wurden mit 1 µg LPS (E.coli J5) versetzt. Das so behandelte Plasma wurde 5 mal über die Säule geleitet. Nach dieser Behandlung wurde der LPS-Gehalt im Plasma mit dem Limulus-Test mit < 50 pg/ml bestimmt.

Patentansprüche:

1. Immunadsorber zur Entfernung von Endotoxinen aus Flüssigkeiten gekennzeichnet durch Trägermaterialien aus organischen oder synthetischen Polymeren mit gebundenen Antikörpern, die gegen Endotoxine gerichtet sind.
2. Immunadsorber nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Antikörper aviäre Antikörper des Typs IgY sind.
3. Immunadsorber nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Antikörper überwiegend gegen die speziesübergreifende „Core Polysaccharide“ und/oder den Lipid A-Anteil der Endotoxine gerichtet sind.
4. Immunadsorber nach Anspruch 1 bis 3 dadurch gekennzeichnet, daß die Antikörper kovalent oder adsorptiv an das Trägermaterial gebunden sind.
5. Immunadsorber nach Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Antikörper über Spacer oder Linker an das Trägermaterial fixiert sind.
6. Immunadsorber nach Anspruch 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Trägermaterial aus Membranen oder Partikeln aus z.B. Zellulosederivaten oder Acrylaten besteht.
7. Verfahren zur Herstellung von Immunadsorbern gemäß der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß an Trägermaterialien aus organischen oder synthetischen Polymeren, Antikörper, die gegen Endotoxine gerichtet sind, kovalent oder adsorptiv gekoppelt werden.
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Antikörper durch Immunisierung vorzugsweise von Kleinsäugern, wie Mäusen, Ratten oder Kaninchen oder Vögeln, wie z.B. Hühnern, mit dem entsprechenden Antigen hergestellt werden.
9. Verwendung von Immunadsorbern gemäß Ansprüchen 1 bis 6 als wirksamer Bestandteil einer Vorrichtung zur Entfernung von Endotoxinen aus Flüssigkeiten, wie Blutplasma oder pharmazeutischen Zubereitungen.

10. Verwendung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Immunadsorber für die Plasmapherese bei Patienten mit Endotoxämie und/oder Sepsis eingesetzt werden.